

平成 23 年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」 K⁺チャネルでのゲーティングの微視的機構の解明

研究代表者： 炭竈 享司（医学部・特命助教）

概 要	
<p>これまで、開状態の K⁺チャネル(KcsA)において、pH センサードメインがどのような構造を取っているのかは実験的には分かっていない。そこで本研究では、分子動力学法を用いたコンピュータシミュレーションにより、KcsA の開構造、特に pH センサードメイン近傍の構造の解明を試みた。その結果、これまで報告されている KcsA の開状態の X 線結晶構造では欠損している pH センサードメインの構造を予測することができ、それは細胞質側に大きく開いた構造を取ることが分かった。実際、イオン透過の様子をシミュレートしたところ、その大きな孔を通りイオンは輸送され、イオン透過の濃度依存性は実験と対応するものであった。また、原子間力顕微鏡による測定との比較も行っており、その結果、pH センサードメインは定まった構造を取らず、大きく揺らいでいることを解明した。</p>	
関連キーワード	イオンチャネル、KcsA、ゲーティング、イオン輸送、分子動力学、原子間力顕微鏡

研究の背景および目的

イオンチャネルとは、神経細胞において活動電位を発生させ、シグナル伝達を行うタンパク質である。すなわち、生体での神経伝達を司る分子である。活動電位の発生はイオンの輸送によって行われるが、それは受動輸送であるため、イオンは電気化学的勾配に従って輸送される。したがって、イオンチャネルが開構造であれば、イオンはネルンスト電位に至るまで流出し続けてしまう。そこで、イオンチャネルがイオンの輸送を制御するためには、構造変化によりその開閉を行う必要があり、これをゲーティングと呼ぶ。このように、ゲーティングはイオンチャネルの根幹的機能の 1 つである。

イオンチャネルの研究の 1 つの転換点は、1998 年の MacKinnon らによる K⁺チャネル(KcsA)の X 線結晶構造の解明である。KcsA の構造が解かれたことにより、イオンチャネルの機能であるイオンの透過・選択性・ゲーティングの微視的機構を原子レベルから解明する糸口が与えられ、その功績により MacKinnon は 2003 年のノーベル化学賞を受賞している。しかし、MacKinnon らの解いた KcsA の構造では、細胞質に突き出す α ヘリックスが束を形成して絞り込みを作っており、イオンが通れるような孔は見つからなかった。つまり、解明された KcsA の構造は閉状態であり、そのためイオンの透過の全貌は明らかにならなかった。一方、

その構造からは、ヘリックス束による絞り込みを解消するような構造変化によりゲーティングが起きると予想された。実際、KcsA は細胞内 pH の変化を感知して閉構造から開構造へ構造変化するが、絞り込みを形成しているヘリックス束上に pH センサードメインが見つかっている。その後、2010 年に Perozo らにより、KcsA の開構造がようやく解明された。ところが、その構造は pH センサードメインを含んでおらず、イオンがどのような大きさ・形の孔を通して透過しているのかは不明のままである。

これまで当研究室では、KcsA がゲーティングする際にねじれ運動を起こすことを Diffracted X-ray Tracking(DXT)法により解明しているが、KcsA の原子配置に関する詳細な知見は得られておらず、開構造での pH センサードメインの構造は分かっていない。そこで、本研究の目的は、細胞質内ドメインを切った KcsA について、分子動力学(Molecular Dynamics; MD)法を用いたコンピュータシミュレーションにより、ゲーティングに重要な役割を果たすと考えられている pH センサー周辺の原子レベルでの構造を解明することとする。また、得られた構造が実際にチャネルとしての役割を担えるのか、すなわち、イオンを透過させることが出来るのかも解明する。

研究の内容および成果

MD 法によるコンピュータシミュレーションとは、Newton の運動方程式を解くことにより、時々刻々の原子の座標・速度を求める方法である。MD シミュレーションでの時間・空間解像度は、それぞれフェムト秒(1 フェムト秒 = 1×10^{-15} 秒)、サブ Å (= 1×10^{-10} m)であり、要するに超高性能の顕微

鏡で観察するようなものである。また、MD 法では仮想的な力を原子に加えることもでき、構造変化を観測することも出来る。本研究の目的は、KcsA の原子レベルでの開構造の決定であり、したがって、MD 法は適切な研究手法と言える。

前述したように、MacKinnon らの構造は pH セ

ンサードメインを含んでいるが、閉構造である。一方、Perozo らの構造は開構造であるが、pH センサードメインを含まない。そこで、MacKinnon らの構造を Perozo らの構造に向けて構造変化するように、 C_{α} に力を加えた MD 計算を行った。その際、pH センサードメインには力を加えず、自由に動けるようにして、どのような構造に至るかを調べた。

まず、図 1 に X 線結晶構造解析で判明している KcsA の開構造について白で示した。pH センサードメインはそれより細胞質側に位置しており、この構造では欠損している。本研究の MD 法によるシミュレーションによって、Perozo らの X 線結晶構造よりさらに先の構造が得られ、pH センサードメインは大きく開いた構造（図 1 の黒色）を取る事が分かった。構造が大きく開いていることは、それが開構造であり、イオン透過が可能であることを示唆している。

そこで、この構造が実際にイオンを透過させることができるのか？を調べるため、MD シミュレーションによりイオンの透過の様子を観測した。その結果、イオンは大きく開いた孔を通して、細胞質側から細胞外側に輸送された。KcsA を通るイオンの透過速度は、高濃度でも飽和することなく、イオン濃度にほぼ比例することが実験的に知られているが、本研究でのコンピュータシミュレーションによっても同様の振る舞いが観測されている。したがって、本研究により得られた構造は、開構造と結論される。

さらに、本研究の構造が実験による観測とどの程度対応しているのかを調べるため、名古屋工業大学の出羽グループでの原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope: AFM) による観測とも比較している。AFM では、結晶構造より長く見えるものの、MD 計算で得られた構造よりは短かった。これは、シミュレーション中の開構造の pH センサードメインは閉状態では見られない大きな運動をしている様子が観測されており、したがって、揺らぎの大きな pH センサードメインを AFM では完全に観測することが難しかったと考えられる。同様に、それらの領域は、大きな揺らぎにより低温でも結晶の構造を取ることが出来ず、したがって X 線結

晶構造解析においても欠損していたと考えられる。

本研究は、このように KcsA の pH センサードメインの構造を解明し、開状態においてはそれが大きく揺らいで運動していることを解明した。本研究で得られた構造は、十分に広い孔を持っているため、イオン透過が可能であり、実験と同様の濃度依存性を示すことが分かった。今後の展望として、今回は計算に含まなかった細胞質ドメインを含んだ開状態の構造の解明がある。また、閉状態から開状態への構造変化の機構についても解明する必要があり、チャネル病の分子的原因や麻酔の作用機序の基礎的な知見を与え得ると考えられる。

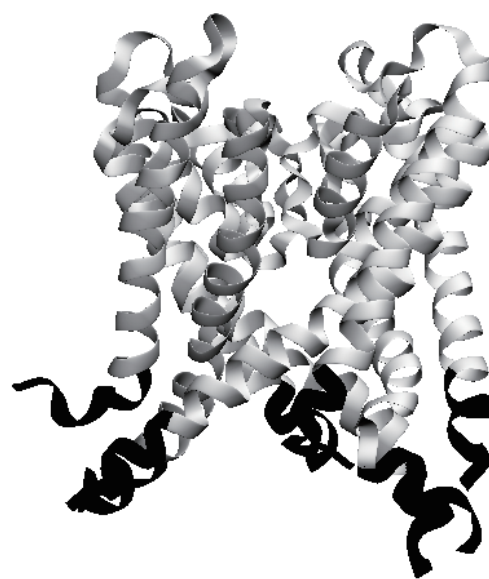


図 1. コンピュータシミュレーションによって得られた細胞質内ドメインを切った KcsA の開構造。紙面上が細胞外、下が細胞内である。白く示したのは Perozo らが解明した KcsA の X 線結晶構造であり、コンピュータシミュレーションでは、さらに pH センサードメインを含む黒色の部位までを得ている。この構造は大きく広がった孔の形をしており、イオンはその中を通して透過する。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

“Role of Central Cavity in Ion Permeation through the Kv1.2 Channel” Takashi Sumikama, Shinji Saito, and Shigetoshi Oiki, *Biophys. J.* **102**, 333a (2012).

“Ion Entryway of the Membrane-Embedded KcsA Potassium Channel Viewed from the Cytoplasmic Side” Ayumi Sumino, Takashi Sumikama, Masayuki Iwamoto, Takehisa Dewa, and Shigetoshi Oiki (投稿予定)

「計算機シミュレーションで見るイオンチャネルにおけるイオン透過」炭竈享司、老木成稔 日本生理学会雑誌 第 74 巻 第 2 号 65 頁 (2012)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費助成事業 若手研究 B 平成 24-25 年

「カリウムチャネルにおける pH 変化によるゲーティング機構とその生理学的意義の解明」

代表 申請中 500 万円